

学校编码: 10384

学号: 200426020

分类号_____密级_____

UDC_____

厦门大学

硕士学位论文

重组 Pin1 蛋白的表达，纯化及其结晶

Expression, Purification and Crystalization of Pin1 protein

邓爱华

指导教师姓名: 吴学记 讲师

刘仁海 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2007 年 4 月

论文答辩时间: 2007 年 6 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 高亚辉 教授

评阅人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非盈利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内大“√”

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

1 前言.....	4
1.1 Pin1基因及Pin1蛋白质结构.....	5
1.2 Pin1功能的调控.....	6
1.3 Pin1与细胞周期的调控.....	7
1.4 Pin1 与各种疾病的关系.....	11
1.5 蛋白质晶体学原理与结晶优化.....	16
1.6 本课题的研究目的与意义.....	19
2 材料和方法.....	20
2.1 材料.....	20
2.2 方法.....	24
3 结果与分析.....	31
3.1 IPTG诱导表达情况及可溶性分析.....	31
3.2 目的蛋白的大量纯化及分析鉴定.....	31
3.3 圆二色谱分析.....	35
3.4 蛋白质晶体的形成.....	39
4 讨论.....	43
4.1 两个突变位点的选择.....	43
4.2 蛋白纯化.....	43
4.3 晶体形成.....	45
参考文献.....	49
致谢	

Catalogue

1 Introduction	4
1.1 Pin1 and structure of pin1 protein.....	5
1.2 Regulation of Pin1 function	6
1.3 Pin1 and cell cycle regulation	7
1.4 Relationship between Pin1 and diseases	11
1.5 Principle of crystallography and crystal optimization	16
1.6 Purpose and significance of the reseach	19
2. Materials and methods	20
2.1 Materials	20
2.2 Methods	24
3. Results and analysis	31
3.1 Analysis of resolvability of Pin1	31
3.2 Purification and Analysis of Pin1 protein	31
3.3 Circular dichroism spectrum analysis	35
3.4 Generation of crystal	39
4. Discussion	43
4.1 Choice of two mutants	43
4.2 Purification of protein	43
4.3 Generation of crystal	45
References	49
Ackowlegement	

摘 要

蛋白质激酶 Ser/Thr-Pro 保守序列中 Ser/Thr 的可逆磷酸化是细胞各种生命活动的重要信号调控机制,其失调将导致各种人类疾病的发生。Pin1 是人类高度保守的特异性磷酸化肽基脯氨酸顺反异构酶,它作用于脯氨酸所形成的肽键,并且仅使磷酸化 pSer/Thr-Pro 发生异构,即由顺式变为反式,从而影响底物蛋白的功能。最近研究显示:这种由 Pin1 介导的磷酸化蛋白构象的改变是重要的细胞信号调控机制。目前,已有 20 多种 Pin1 的底物被分离出来,包括 Cdc25、Weel、Mytl、Cdc27、CyclinD1 和 β -catenin 等,与这些蛋白的相互作用说明 Pin1 可能在细胞周期调控和信号转导过程中发挥着重要的作用。在癌症病人体内普遍发现 Pin1 过度表达;此外,抑制 Pin1 的功能会导致细胞凋亡,已有研究发现 Pin1 失调与阿尔茨海默氏病的神经凋亡相关。

Pin1 分子量为 18KD,包含两个结构域:一个是由 39 个氨基酸残基组成的 N 端 WW 区,介导 Pin1 与磷酸化蛋白质的结合;另一个为 C 端的肽基脯氨酸顺反异构酶(PPIase)区,由 120 个氨基酸残基组成。对 Pin1 结构的研究于 1997 年就有报导,现阶段对其结构的研究主要集中于 Pin1 与短肽的相互作用的研究,而对于 Pin1 与生物底物的研究甚少。因此本论文选择分别在 Pin1 两个结构域的关键氨基酸 W34 和 K63 进行突变,并对其进行大量表达、纯化。然后用悬吊液滴蒸汽扩散法筛选出了 Pin1-W34A 和 Pin1-K63A 的结晶条件,并按照该条件得到成形晶体。通过 X-Ray 衍射分析收集晶体相关数据,研究结果显示:Pin1-W34A 晶体属于 P4(3)2(1)2 空间群;Pin1-K63A 晶体属于 P3(1)21 空间群。同时还用圆二色谱分析了 W34A 及 K63A 突变位点的引入对 Pin1 蛋白整体构象的影响,研究结果表明突变的引入并未引起 Pin1 蛋白构象的显著变化。同时本研究筛选 Pin1 与底物 cdc25 的复合物的结晶条件并获得单晶。该研究为进一步研究 Pin1 的作用机制奠定基础,并为以后基于 Pin1 的新药设计提供结构理论依据。

关键词: Pin1; 圆二色谱; 结晶

Expression, Purification and Crystalization of Pin1 protein

Abstract

Protein phosphorylation on certain serine or threonine residues preceding proline (Ser/Thr-Pro) is a pivotal signaling mechanism in diverse cellular processes and its deregulation can lead to human disease. Pin1 is a highly conserved enzyme that isomerizes only the phosphorylated Ser/Thr-Pro bonds in certain proteins, thereby inducing conformational changes. Recent results indicate that such conformational changes following phosphorylation are a novel signaling mechanism pivotal in regulating many cellular functions. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is an essential protein in regulating cell entry into mitosis by catalyzing the conformational change of many critical proteins. So far, more than 20 Pin1 targets have been isolated, such as cdc25, Weel, Mytl, cdc27, cyclin D1 and β -catenin, suggesting that Pin1 might play an important role in the cell cycle regulation, signal transduction and human disease. Overexpression of Pin1 is prevalently found in human cancers, whereas its inhibition induces apoptosis and contributes to the neuronal death in Alzheimer's disease.

Pin1 is a protein of 18KD, with two-domain structure, consisting of an N-terminal WW domain and a C-terminal PPIase domain, which together form a double-check mechanism. The WW domain binds to only specific pSer/Thr-Pro motifs that are oftencrucial regulatory phosphorylation sites in Pin1 substrates. The binding of WW domain targets Pin1 to its substrates, whereas its PPIase domain isomerizes specific pSer/Thr-Pro motifs to induce conformational changes. Although the structure of Pin1 has first been determined in 1997, and studies on its structure basis has also been on focusing on the interaction of Pin1 with its short peptide substrate (4 to 7 amino acid residues), very little is known about how Pin catalyzes its reaction, and how Pin1 interacts with its biological substrates. Therefore, in the current studies, We desinged wo mutants in each domain (W34A&K63A) and expressed in E.coli BL21(DE3). The

two-step purification by affinity chromatography and FPLC (fast performance liquid chromatography) were developed to yield wild and mutant Pin1 protein. Crystals of wild and mutant Pin1, Pin1/cdc25 complex were obtained by the hanging drop vapor diffusion method and many different crystals forms were observed. The result indicate that crystal of W34A belongs to space group $P4(3)2(1)2$, with unit-cell parameters $P3(1)21$ $a=b=49.011 \text{ \AA}$; $c=136.796 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90$ and diffracted to 2.5 \AA . crystal of K63A belongs to space group $P3(1)21$, with unit-cell parameters $a=b=68.646 \text{ \AA}$; $c=79.412 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90$, $\gamma=120$, and diffracted to 2.6 \AA . Meanwhile The conformation of protein Pin1-wildtype, pin1-W34A and Pin1-K63A were analyzed by circular dichroism (CD) analysis. we found there were no significant differences between them. We hope it would provide a structural basis for rational drug design.

Key words : Pin1 ; Circular dichroism (CD) ; Crystalization

1 前言

肽基脯氨酰顺反异构酶（PPIase）是一种在原核和真核生物体内普遍表达的蛋白，它能催化加速肽基脯氨酸的顺反异构，在蛋白质的折叠/解折叠中起重要作用。它也可能参与蛋白质复合物的组装/解组装、蛋白质运输及调节蛋白质活性^[1]。PPIase按其结构和功能分为三大家族：亲环蛋白(cyclophilin)家族、FK506结合蛋白(FKBP)家族、微小菌素蛋白家族(parvulin family)。亲环蛋白能和免疫抑制剂CsA结合，FKBP则和免疫抑制剂FK506结合，微小菌素蛋白主要是与真核细胞生长密切相关的酶，包括人类Pin1蛋白及酿酒酵母ESS1/Ptf1蛋白酶。这三个家族在主要序列和三维结构上并不相似，却都能催化蛋白质脯氨酸残基N-末端肽键的顺反异构化反应。肽基脯氨酰顺反异构酶是催化蛋白折叠的限速步骤，此异构反应可自主进行，亦可由PPIase催化。但脯氨酸残基前Ser/Thr的磷酸化在很大程度上制约了Ser/Thr-Pro序列中肽键的自发异构并且使其对其他PPIase：如亲环素、FK506结合蛋白以及其他微小菌素的结合具抵抗性。相反，Pin1型PPIase却只能有效催化磷酸化pSer/Thr-Pro的异构，而对非磷酸化Ser/Thr-Pro无催化异构作用^[2]。

蛋白质分子在其脯氨酸前的丝/苏氨酸基序(Ser/Thr-Pro motif)发生可逆磷酸化是调节蛋白质功能的一种重要机制，但研究证明这仅是改变蛋白质功能的第一步，这类磷酸化蛋白一定区段内磷酸化丝/苏氨酸基序(pSer/Thr-Pro motif)还必须被多肽基脯氨酰顺反异构酶Pin1进行高度专一性的顺反异构化，从而改变靶蛋白的构象，调节靶蛋白的活性、稳定性、磷酸化水平、亚细胞定位以及与其他蛋白质之间的相互作用^[3]。这种新的磷酸化后调节机制，对调节蛋白质的功能起着重要作用。机体内参与调节细胞周期运行、基因转录、及众多信号转导途径等的蛋白质多含有丝/苏氨酸基序，它们的活性和功能均受Pin1的调节。

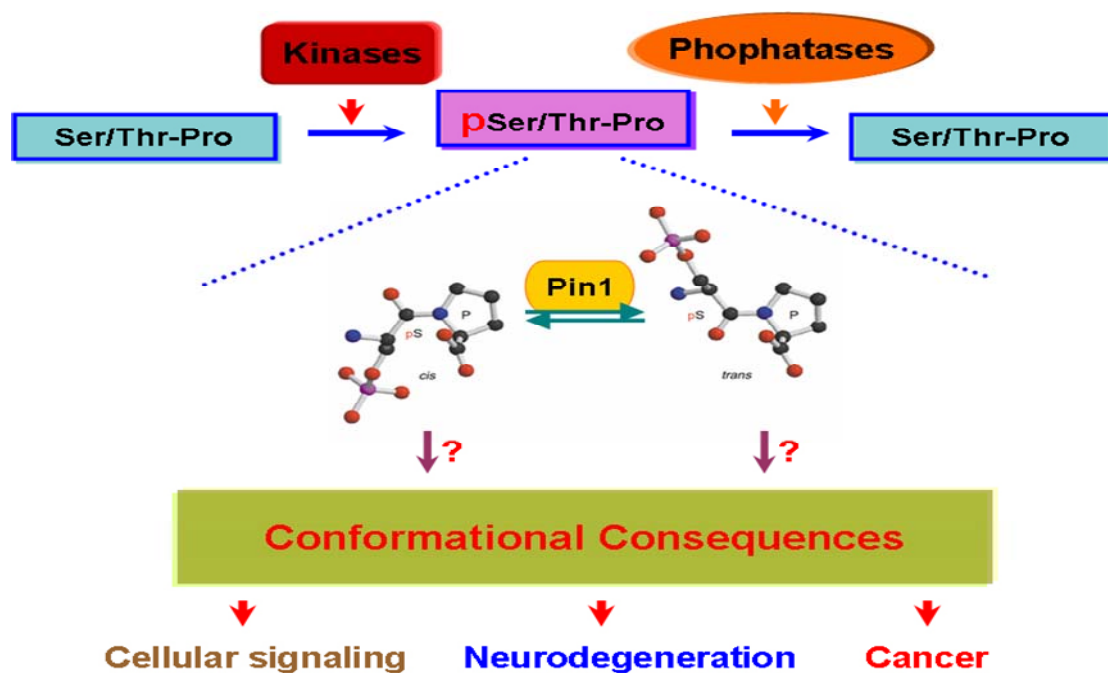


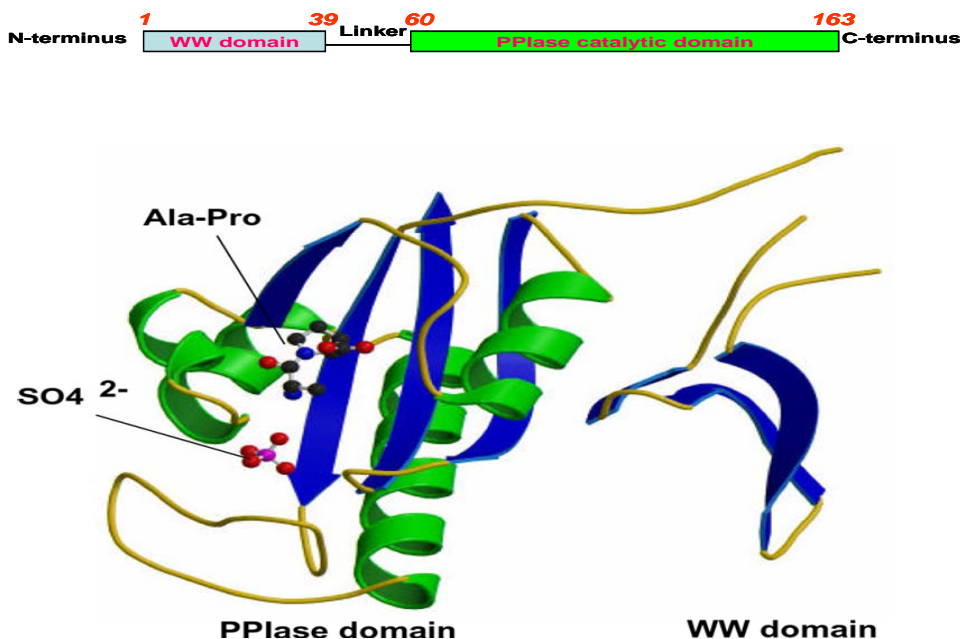
图 1 Pin1 的功能

Fig 1 Pin1 function

Pin1 特异催化磷酸化的 Ser/Thr-Pro 由顺势变为反式，从而调节蛋白功能

1.1 Pin1基因及Pin1蛋白质结构

人类Pin1基因编码一种调节有丝分裂的核蛋白，是肽基脯氨酰顺反异构酶家族成员之一。其有两种非常相似但又不尽相同的转录本，其中一种转录本对应于PIN1基因序列。PIN1定位于19p13；另一成员PIN1L则定位于1p31。二者的cDNA序列同源性达89 %。PIN1L编码的蛋白质的功能尚未完全阐明，PIN1L可能是一个被转录的假基因^[4]。Pin1蛋白是一种相对大分子量(18KDa)的肽基脯氨酰顺反异构酶，由163个氨基酸残基组成，包含两个结构域，一个是氨基末端的色氨酸-色氨酸中心(WW)区，由39个氨基酸残基组成，以两个恒定的色氨酸为特征，介导其与磷酸化蛋白质的结合；另一个为羧基末端的肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase)区，由120个氨基酸残基组成，此区包含活化位点。WW区与PPIase区由一可变性序列连接^[5, 6]。Pin1和靶蛋白的相互作用大致分为三步：首先激酶在Ser/Thr-Pro位点磷酸化底物；然后Pin1结合该位点；最后Pin1催化异构该蛋白，改变其活性^[7]。

Pin1 Structure:**图 2 Pin1 结构****Fig2 The structure of Pin1**

Pin1 由 163 个氨基酸残基组成，包含 N-端与磷酸化蛋白质结合的 WW 区及 C-端的活化位点 PPlase 区

Pin1 无任何信号输出功能，其亚细胞定位取决于 WW 区与底物之间的相互作用^[8]。在体外培养细胞中，Pin1 主要位于细胞核^[8]；但在体内多种细胞类型的胞核和胞质中均发现有 Pin1 的存在^[9, 10]，这很可能是因为在体内细胞质中有更多 Pin1 底物的存在。在阿尔茨海默氏（AD）病人神经元中，Pin1 与磷酸化的 Tau 或者其他有丝分裂磷酸化蛋白单克隆抗体（MPM-2）共定位于细胞质中^[9, 11]。

1.2 Pin1 功能的调控

Pin1 的功能受到多种机制严紧调控。首先，它严格依赖于底物中特定 Ser/Thr-Pro 的磷酸化^[12]。Pin1 仅特异性催化 pSer/Thr-Pro 的异构，而对非磷酸化的 Ser/Thr-Pro 无作用。其次，Pin1 由转录因子 E2F 介导的生长信号诱导表达，其蛋白表达水平随正常细胞周期波动，它在正常细胞内表达量主要与细胞增殖相关^[13]。最后，Pin1 还受转录后修饰，如磷酸化调控^[14, 15]。WW 区₁₆Ser 位于 pSer/Thr-Pro

结合口袋的中心，其磷酸化会抑制Pin1与其底物结合并影响其功能^[15]。Pin1的磷酸化在整个正常细胞周期中均受到调控。此外，Pin1还受蛋白水解的调控。

1.3 Pin1与细胞周期的调控

1.3.1 Pin1与CyclinD

在细胞增值周期中，CyclinD 是 G1/S 期时相转变调控点的重要调控因子。在 G1/S 期，CyclinD 累积达到一定阈值后，即与相应的 CDK(主要是 CDK4 和 CDK6)结合进而作用于 pRb，使之磷酸化后释放 E2F，以启动驱动基因 TX 的转录表达，驱使细胞通过检测点，启动 DNA 复制。抑制 CyclinD 的表达，可使细胞不能从 G1 期进入 S 期，而其过表达则使 G1 期缩短。

Pin1 可直接或间接与 CyclinD1 相互作用而调节细胞周期。Pin1 基因的启动子有 3 个 E2F 的结合位点。E2F 家族蛋白都可以与这些位点结合而激活 Pin1 启动子。E2F/Rb 通路异常可引起 Pin1 的高表达。

Pin1 可经 Ras 信号转导途径活化 c-jun，增强 CyclinD1 的转录。Ras 经一个信号级联反应而活化一系列蛋白激酶，特别是 MAPK(丝裂素活化蛋白激酶)，它直接使 c-jun 的第 63, 73 位 Ser 磷酸化，无活性的 c-jun 变为有活性的 c-jun^[16]。Pin1 与磷酸化的 c-jun 结合并将其异构化，使磷酸化的 c-jun 由顺式变为反式，并使其完全活化，活化的 c-jun 继而激活 CyclinD1 启动子的 AP-1 位点，导致 CyclinD1 的表达。AP-1 编码转录因子 Jun, Fos 等，在 CyclinD1 启动子有结合位点^[17]。抑制体内的 Pin1，使磷酸化 c-jun 的转录活性降低^[16]。在鼠的研究中，去除 CyclinD1 基因，抑制 Neu/ras 引起的乳腺癌的发展^[18]。

Pin1 也经 β -catenin信号转导通路上调CyclinD1。 β -catenin是一种多功能蛋白质，能与20多种蛋白结合。如 β -catenin与E-cadherin相连，构成上皮钙黏连素-连环素复合体（E-cadherin/ catenin）介导细胞间的黏附^[19]，而细胞浆中的 β -catenin 与大肠腺瘤息肉样蛋白（adenomatous polyposis coli, APC）复合体结合，从细胞核转移到细胞质并经泛素-蛋白酶小体系统降解^[20]。Pin1与 β -catenin邻近APC结合位点的第246位pSer/Thr-Pro基序结合并使其异构化，使 β -catenin不能与APC作用，导致 β -catenin在细胞核内聚集。Pin1与磷酸化的 β -catenin结合，使 β -catenin异构化，作用于CyclinD1启动子的TCF(T-Cell factor)位点，提高了 β -catenin/TCF信号转导通路激活下游靶基因的能力，从而使CyclinD1转录增强，表达上调^[21, 22]。Pin1

剔除小鼠中 β -catenin表达下调，这与CyclinD1基因剔除小鼠表型相似^[22]。致癌基因转录激活子 β -catenin的上调在癌症的发展中发挥关键作用。

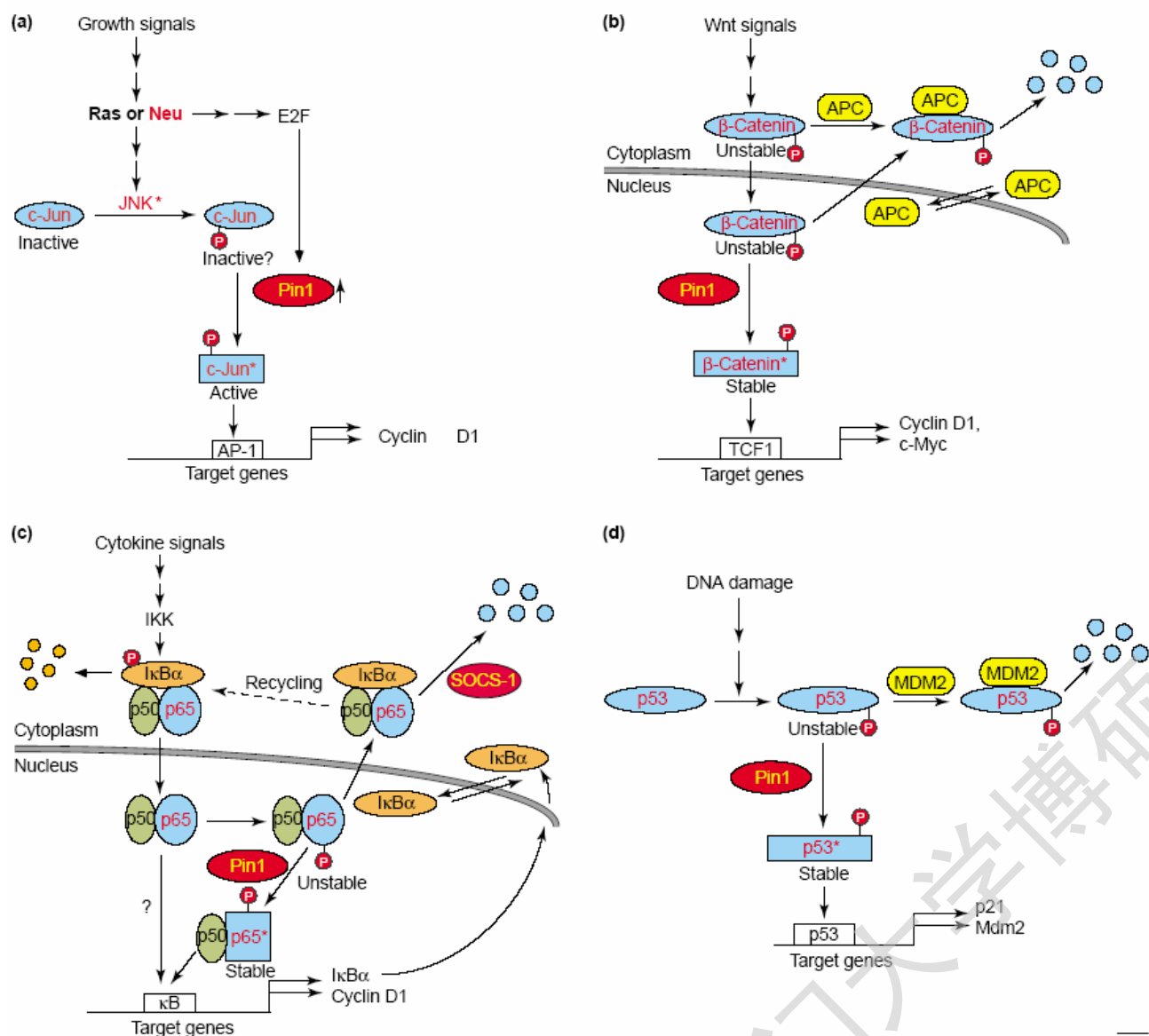


图3 Pin1在多种信号途径中作为关键催化剂起作用

Figure 3 The functions of Pin1 as a key catalyst in multiple signaling pathways

蛋白质分子Ser/Thr-Pro模体(motif)中丝/ 苏氨酸的可逆性磷酸化是调节各种信号途径的一种重要机制。如生长因子诱导的c-Jun的磷酸化(图a)，Wnt因子引起的 β -钙调素的磷酸化(图b)，细胞因子信号诱导的NF- κ B的磷酸化(图c)，以及DNA损伤引起的p53的磷酸化(图d)。

Pin1通过NF- κ B途径增强CyclinD1的转录。NF- κ B信号由IKK介导核转录因子NF- κ B(nuclear factor- κ B)磷酸化和随后NF- κ B抑制因子I κ B α 降解而激活^[23]。使

*NF- κ B*转移到核内激活转录。*NF- κ B*的目的基因之一就是I κ B α ，它能使核*NF- κ B*转移到胞质中并抑制它的活性^[23]。在细胞因子刺激下，Pin1与*NF- κ B*的P65/RelA亚基的pThr254-Pro基序结合，阻止了*NF- κ B*与其抑制物I κ B α 的结合及*NF- κ B*的核外转运和泛素介导的蛋白水解。这样便增强了*NF- κ B*蛋白的稳定性及其在核内的聚集，并增强了它的靶基因CyclinD1等的转录活性^[24]。

综上，信号转导通路由癌基因Neu/Ras活化的多种脯氨酸蛋白激酶激活，最终有多种转录因子，包括E2F，C-jun/AP-1， β -catenin，*NF- κ B*而加强CyclinD1的转录，CyclinD1的稳定性由后转录磷酸化位点Thr286-Pro调控^[25, 26]。CyclinD1是Pin1重要的靶基因之一，Pin1不仅可以从转录水平促进CyclinD1的转录，而且还可以通过诱导CyclinD1的构象改变阻止其从胞核内迁移至胞浆降解，从而引起CyclinD1的过表达。促进细胞的转化增值^[16]。上调Pin1能够通过激活C-jun/AP-1， β -catenin/TCF，和*NF- κ B*转录因子而提高CyclinD1的表达水平^[27, 28]。Pin1也可直接结合CyclinD1磷酸化的Thr₂₈₆-Pro基序，并通过抑制其入浆而稳定核CyclinD1^[29]。Pin1的表达被Neu/Ras经由E2F上调，Pin1上调正反馈加强Neu/Ras的下游信号和CyclinD1的稳定性^[30]。

1.3.2 Pin1 与 Cdc25

磷酸酶是一种重要的有丝分裂调节因子。在有丝分裂期间，它的活性由其定位及磷酸化状态调节。在间期，Cdc25以一种低磷酸化的状态存在，与14-3-3蛋白共定位于胞质中，阻止其过早的进入分裂期，活性较低。进入分裂期后，其活性以一种未知机制迅猛增加，这一机制至少包括四个不同的反应过程：（1）在至少两种激酶Cdc2/cyclinB/P9和Plx1 (polo-like kinase)的作用下，Cdc25 N端调节区域的12-20个不同位点被磷酸化；（2）14-3-3蛋白从Cdc25上解离下来；（3）Cdc25C从胞质转移到胞核；（4）在Cdc25的某一位点与Pin1作用。

Cdc2/CyclinB复合物在细胞周期调控占据重要作用。细胞分裂周期蛋白2 (Cdc2)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，对磷酸化位点羧基末端的脯氨酸有催化特异性。Cdc2经磷酸化和脱磷酸化的调节过程被激活，充当细胞周期的发动机。Cdc2/cyclinB使Cdc25磷酸酶磷酸化而活性升高。Plx1 (polo-like kinase)是Cdc25活性正调节子，在间期和分裂期，Pin1直接作用Plx1^[31]。PP2A(脯氨酸指导的蛋白酶)仅作用于反式构象的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸，使其去磷酸化，Pin1增强PP2A

对反式 Cdc25 的作用, 使其去磷酸化^[32]。

Pin1 对 Cdc25c 进行调节而影响细胞周期的作用主要依赖于 Cdc25c 的磷酸化状态^[33]。研究显示: 在 G2 期向 M 期过渡中, Cdc2 激酶和 Plx1 使 Cdc25 磷酸化后, Pin 1 的 WW 区与 Cdc25 氨基末端调节区的丝-脯氨酸或苏-脯氨酸残基结合, 它的 PPlase 区使 Cdc25 构象改变, 增加了 Cdc25 的活性^[34, 35, 36], Cdc25 磷酸酶又可使 Cdc2 第 14, 15 位苏氨酸快速去磷酸化而恢复活性。去除 Pin1, Cdc25 活性不被充分激活。在间期后期, Pin1 与被 Cdc2/cyclinB 激酶复合物而不是 Plx1 磷酸化的 Cdc25 结合, 引起 Cdc25 的构象改变, 由顺式变为反式, Cdc25 的活性, 导致 Cdc2 第 14, 15 位苏氨酸的磷酸化, 使其在间期的活性受抑制^[31]。去除 Pin1, Cdc25 活性不被抑制。Pin1 依赖 Cdc25 磷酸化状态而激活或抑制其活性。以前研究表明, 去除 Pin 1 细胞过早由 G2 期进入 M 期, 且伴随 Cdc25 的高度磷酸化^[37]。Pin1 的过度表达导致 G2 期停滞, 可能是 Pin1 使 Cdc25 活性降低所致^[34]。在 DNA 损伤后, 去除 Pin1, 不能使细胞周期停滞, 意味着 Cdc25 和 Pin1 可能是维持细胞周期检测点停滞状态重要因素^[37]。

Pin1 还和 G2 期向 M 期过度点依赖磷酸化的调节子 Weel, myt1 作用^[34]。Pin1 对 Cdc25 进行调节而影响细胞周期作用的不同, 可能是因为 Pin1 还作用其它的调节子调节 Cdc25。

1.3.3 Pin1 与 P53

P53 基因是与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因^[38]。抑癌基因 P53 参与细胞周期的调控, 其中重要的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDK) 抑制蛋白 P21 的转录受 P53 的正调控。DNA 损伤诱导 P53 表达, 后者使 P21 表达上调, 从而使细胞停留在 G1 期, 抑制细胞增殖。在除去 Pin1 的瘤细胞 P53 和 P21 表达几乎不增加, 但无 Pin1 的细胞中, 在 DNA 损伤后, 出现细胞周期检测点缺陷^[39]。

DNA 损伤引起 P53 聚集和 P53 稳定性增加。聚集的 P53 蛋白使 P21 基因表达上调, 使细胞周期阻滞于 G1/G2 期, 直至 DNA 损伤得以修复, 或指导细胞走向凋亡^[40]。Pin1 可以加强 P53 这种功能, 即 Pin1 与磷酸化的 P53 结合, 改变其构象, 阻止了 P53 与泛素化蛋白酶 MDM2 的结合, 加强 P53 的稳定性, 增强其对 P21 基因启动子的转录激活作用, 阻止损伤后的 DNA 进入细胞周期, 保持遗传物质的稳定性^[41, 42]。近来研究发现, Pin1 对 P53 家族成员之一的 P73 也有类

似作用^[43]。说明 Pin1 可能是细胞周期控制点的重要组成成分。

Pin1 加强 P53 稳定性, 抑制肿瘤形成。而前面所述均是 Pin1 增强癌基因的表达。这说明 Pin1 在生理和病理状态下作用不同: 在生理条件下, Pin1 调节 P53 对细胞周期检测点的调控和维持基因稳定性有重要意义; 在病理条件下, Ras/Neu 等癌基因诱导 Pin1 过度表达, 这种调节机制出现缺陷, Pin1 高表达引起的致癌信号途径可能超过它本身引起的 DNA 修复机制。另外, Pin1 可能同样加强突变型 P53 稳定性, 促进肿瘤的形成。所以, Pin1 介导的 P53 的调节机制还有待更加深入的研究。

1.3.4 Pin1 与 RNA 聚合酶 II

RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNAPII) 是与所有结构基因转录有关的催化酶, 催化前体 mRNA 的转录过程。在 HeLa 细胞中, Pin1 可以与高度磷酸化的 RNAPII 的 C 末端重复序列(C-terminal domain, CTD 区)结合, 抑制 RNAPII 的去磷酸化, 可能有助于细胞在有丝分裂期关闭转录^[44]。

RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNAPII) 羧基末端控制域(CTD)富含丝/苏-脯氨酸基序, 在前期 RNA 的转录和成熟 RNA 的形成中占据重要地位。在体外, Pin1 通过抑制 CTD 磷酸酶 Fcpl 和促进 cdc2/cycling 的磷酸化从而影响 CTD 的磷酸化状态。在体内, 敲除 Pin1 的细胞有亚磷酸化的 RNAPII 的聚集; 在体外, 诱导 Pin1 过表达的细胞, 可见过磷酸化的 RNAPII 聚集, 且这种过磷酸化 RNAPII 以依赖 Pin1 的方式在 M 期聚集。更为重要的是: Pin1 过表达特异抑制体内前期 mRNA 的转录和 RNAPII 刺激引起的前体 mRNA 的剪接和转录。因此, Pin1 在调节 RNAPII 的结构和功能中扮重要角色^[44]。

1.4 Pin1 与各种疾病的关系

1.4.1 Pin1 与癌症

蛋白质序列中的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸键的磷酸化, 是控制细胞周期循环、调节细胞增殖和分化的关键性信号调节机制。Pin1 能使磷酸化的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸键异构化, 调节磷酸化蛋白质的活性, 在人类恶性肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。而且, Pin1 本身也受这一信号调节机制的影响, 协同癌基因作用, 促进细胞的增殖和恶变。Pin1 在多数的哺乳动物细胞中表达。正常细胞中, Pin1 活性极低, 且仅定位于细胞核; 在大多数肿瘤细胞中, Pin1 过度表达, 且主要定

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕